




METHOD OF MEASURING FRUCTOSAMINE

Patent number: JP63182567
Publication date: 1988-07-27
Inventor: MAAREI EE ROOZENTARU
Applicant: ISOLAB INC
Classification:
- international: C12Q1/00; G01N33/66
- european:
Application number: JP19870009774 19870119
Priority number(s): US19860816574 19860106

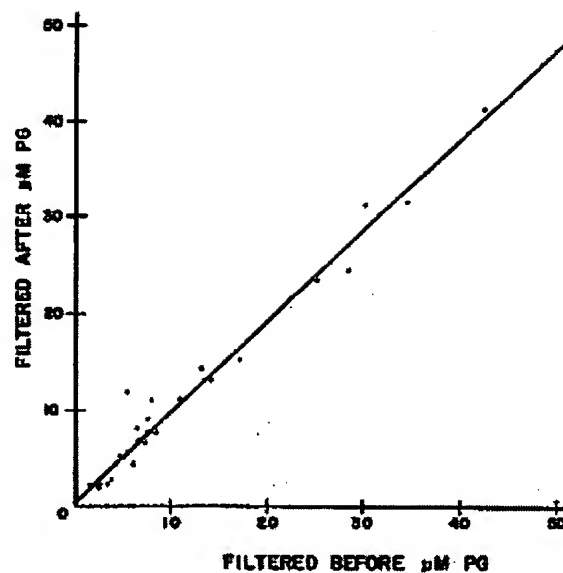
Also published as:

 EP0230343 (A2)
 JP62215398 (A)
 EP0230343 (A3)

Abstract not available for JP63182567

Abstract of correspondent: **EP0230343**

Methods and tests to determine the concentration of phosphatidylglycerol (PG) in amniotic fluids to aid in the diagnostic indication of fetal lung maturity are described.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑩ 日本国特許庁(JP)
⑫ 公開特許公報(A)

⑪ 特許出願公開

昭63-182567

⑬ Int.Cl.

G 01 N 33/66
C 12 Q 1/00

識別記号

庁内整理番号

C-8305-2G
8412-4B

⑭ 公開 昭和63年(1988)7月27日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 フルクトサミン測定方法

⑯ 特 願 昭62-9774

⑰ 出 願 昭62(1987)1月19日

⑱ 発 明 者 マーレイ エー. ロー アメリカ合衆国 オハイオ州 44313 アークロン クリ
ゼンタル アブルツク ドライブ 530⑲ 出 願 人 アイソラブ, インク. アークロン合衆国 オハイオ州 44203 バーバートン
ウースター ロード 5552

⑳ 代 理 人 弁理士 窪谷 剛至

明 細 書

1. 発明の名称

フルクトサミン測定方法

2. 特許請求の範囲

1. 血液検体又は血液に由来する検体における血糖グルコース値を測定する方法において、前記検体中より妨害物質を除去して検体のPH値を10及び14の間に調整し、呈色作用物質を前記検体に加え、然る後、前記検体中の発色した色を測定し、次いで、その色の測定値を標準液の色と比較し、前記呈色作用物質の選択条件及びPHの条件として、前記検体中のグルコースが検体血液中の蛋白質のアミン族と依然反応または会合している間であつ該グルコースが分子転位を経てフルクトサミンの形態で存在している時に、呈色作用物質が該グルコースによって呈色の変化を起こすことを条件とする血糖グルコース値の測定方法。

2. 前記検体を強塩基または酸化剤又は酵素により処理するか、もしくは検体を脱塩するこ

とにより、前記妨害物質を除去することからなる前記特許請求の範囲第1項記載の血糖グルコース値の測定方法。

3. 前記PH値が10.5及び10.8の間にある前記特許請求の範囲第1項記載の血糖グルコース値の測定方法。

4. 前記検体に緩衝剤を加えることにより前記PH値を調整する前記特許請求の範囲第1項記載の血糖グルコース値の測定方法。

5. 前記緩衝剤が、適当な配合のもとで炭酸ナトリウム及び重炭酸ナトリウムからなる前記特許請求の範囲第4項記載の血糖グルコース値の測定方法。

6. 前記呈色作用物質がテトラゾリウム塩類である前記特許請求の範囲第1項記載の血糖グルコース値の測定方法。

7. 前記テトラゾリウム塩類がINTである前記特許請求の範囲第6項記載の血糖グルコース値の測定方法。

8. 検体中のフルクトサミン値を測定する方

法であって、妨害物質を除去し、検体のPH値を10及び14の間に調整し、フルクトサミンと反応して呈色する呈色作用物質を前記検体に加え発色させ、然る後、呈色測定を行ない、前記呈色作用物質で呈色した色を伴った前記呈色結果の色とフルクトサミン標準液とを比較することからなる検体中のフルクトサミン値測定方法。

9. 前記検体を37°C以上の温度で保存することにより前記妨害物質を除去する前記特許請求の範囲第8項記載のフルクトサミン値測定方法。

10. 強塩基又は酸化剤又は酵素による処理か、もしくは脱塩処理により前記妨害物質を除去する前記特許請求の範囲第8項記載のフルクトサミン値測定方法。

11. 前記PH値が10.5及び10.8にある前記特許請求の範囲第8項記載のフルクトサミン値測定方法。

12. 前記検体に緩衝剤を加えることにより前

記PHを調整する前記特許請求の範囲第8項記載のフルクトサミン値測定方法。

13. 前記緩衝剤が、適当な配合のもとで炭酸ナトリウム及び重炭酸ナトリウムからなる前記特許請求の範囲第8項記載のフルクトサミン値測定方法。

14. 前記呈色作用物質がテトラゾリウム塩類である前記特許請求の範囲第8項記載のフルクトサミン値測定方法。

15. 前記テトラゾリウム塩類がINTである前記特許請求の範囲第8項記載のフルクトサミン値測定方法。

16. 前記検体を37°C以上の温度にて保存することにより前記妨害物質を除去する前記特許請求の範囲第1項記載の血糖グルコース値の測定方法。

17. 前記呈色作用物質と前記血糖グルコースとの反応が酸の添加により停止する前記特許請求の範囲第1項記載の血糖グルコース値の測定方法。

-3-

-4-

18. 前記呈色作用物質と前記グルコースとの反応が酸の添加により停止する前記特許請求の範囲第8項記載のフルクトサミン値測定方法。

19. 前記PH値が5以下である前記特許請求の範囲第8項記載のフルクトサミン値測定方法。

20. 前記PH値を5以下に低下させることにより前記呈色作用物質と前記フルクトサミンとの反応を停止させる前記特許請求の範囲第8項記載のフルクトサミン値測定方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、糖尿病の検査及び患者の糖尿病状態の観察の一助として、血液等の検体中のフルクトサミン(fructosamine)を測定し、それによってグルコース値を測定するための単純呈色測定方法に関する。さらに詳しくは、反応速度方法とは異なるエンドポイント方式のフルクトサミン測定方法及び血糖グルコース値の測定方法に関する。

(先行技術)

フルクトサミンの還元作用によって色の変化を起こす試薬を使用して血清等の検体のフルクトサミン値を測定する比色測定方法は既にヨーロッパ特許第0,085,263号(発明者:ジョン・リチャード・ベイカー(John Richard Baker))より公知となっている。このヨーロッパ特許には、テトラゾリウム塩類から選んだ染色剤を使用する基本的な血清処理が扱われている。該テトラゾリウム塩類として、テトラニトロブルーやテトラゾリウムが挙げられているが、前記ヨーロッパ特許では、特にニトロブルー、テトラゾリウムが好ましいとされている。このニトロブルー、テトラゾリウムは還元されると色調の高い青色(紫色)のホルマザン色素に変化する。ホルマザン色素の最大吸収波長は約535nmである。かかるヨーロッパ特許の方法によれば、一定時間の間隔を挟んで、反応速度に伴う呈色変化を2回測定し、標準物質よりフルクトサミン値すなわちフルクトサミン含有量を算出する方法をとっている。しかし、周知

のように、反応速度に基づく測定方法における手作業の操作は測定のタイミングを確実なものとしねばならず、正確に行なうには困難である。

(目的)

本発明は、フルクトサミンを1回のみで呈色測定する単純呈色測定法を利用し、上記の反応速度方法に要求される一連の測定タイミングの煩わしさを大幅に解消せんとするものである。本発明では、上述したテトラゾリウム塩類を加える前に、フルクトサミン以外の血清中に共存するアスコルビン酸塩やグルタチオン等の還元物質を除去する。

本発明のもう一つ特徴として、妨害物質、即ち他の還元物質を除去すれば、呈色原因のすべてがフルクトサミンとテトラゾリウム塩の反応に限られてくる。そのため、フルクトサミンの反応を停止することが可能となり、呈色の測定におけるタイミングは大して問題にならなくなる。すなわち、フルクトサミンとテトラゾリウム呈色物質が反応している時に、この反応を停

止する溶液を加えれば、時間に拘束されずに分光光度測定を行なうことができる。従って、特定時間に測定せねばならない反応速度法とは違って、都合のよい時に呈色測定を行なうことができる。このように、単純呈色測定法は上記ヨーロッパ特許より時間がかからなくて済むものが主な特徴である。

(発明の実施例)

本発明による方法の一つの特徴として、血液等検体を採集した後、アスコルビン酸塩及び／又はグルタチオン等の還元物質を除去又は破壊し、フルクトサミンを残すよう処理する。このような不要還元物質もしくは妨害物質を除去するには、下記方法のどれを利用してもよい(以下、この処理を妨害物質除去行程と呼ぶ)。

1. 検体を低温度の下で長時間インキュベートする。この場合、塩基を加えても加えなくともよいが、強塩基を加えた方が望ましい。

2. 検体を高温度の下でインキュベートする。この場合、塩基を加えても加えなくともよいが

-7-

強塩基を加えた方が望ましい。

3. 検体を、少なくともPH10以上の高いPH値にてインキュベートする。

4. 検体を、透析又はゲル濾過クロマトグラフィーにより脱塩処理する。

5. フルクトサミン以外の妨害物質を酸化する一つ以上の酸化剤を加える。

6. 呈色試薬と反応を起こさない形態に妨害物質を変化させる酵素を加える。

次に、妨害物質を検体より除去した後、検体と呈色試薬を混合し一定時間インキュベートする。この結果、呈色した色の度合を光度測定法により測定すると、色の度合はフルクトサミン量と比例する。この際、血清自体の色によりバックグラウンドに色が認められ、これを差し引くために血清ブランクも同時に測定してよい。

さて、血清中に存在する生理的還元物質にはグルコース、フルクトース、グルコサミン、クレアチニン、尿酸塩等があるが、この中でもア

-8-

スコルビン酸塩とグルタチオンのみが、テトラゾリウムないし同系列の還元性染色剤に対し極めて大きい妨害作用を示す。このため、検体よりアスコルビン酸塩とグルタチオンを除去又は破壊すれば、単純呈色測定法によってフルクトサミンの量を測定することができる。

ところで、フルクトサミンを除いて、検体中の還元物質の妨害作用を低下及び／又は除去させる方法としては、既に述べた方法のうち一つでもあるいはそれ以上でも利用してよい。しかし、望ましい方法としては、血清に少量の塩基(例えば水酸化ナトリウム)を混合せしめ約PH10まで血清のPH値を高めることである。

次に、この血清検体を少なくとも30分間室温にて放置させる。これによって、妨害作用を効果的に除去することができる。このように処理した検体を上記ヨーロッパ特許の方法に従い測定してフルクトサミンの量を求める。但し、呈色の測定は1回のみである。尚、検体、標準物質、ブランクその他諸々のものをすべて同一

条件の下に測定することが肝要である。また、フルクトサミンとテトラゾリウムの反応においては、PH、時間、温度等の諸因子が常に一定していることが極めて重要な反応条件となる。この点において、反応による呈色の度合いが必ず全検体中のフルクトサミン濃度に比例するよう諸因子のすべてを調整し管理しなければならない。

実例

本発明を具体的に説明するため以下の実例を示す。

実例 1

血清検体を部分標本に分け、室温の下にμLの容量単位にて下記溶液と混合させた。

実験	血清	1.1mM (アスコルビン酸塩)	(0.4N NaOH) H ₂ O	
A	500	0	0	100
B	500	50	0	50

-11-

た。測定した吸光度の結果は以下の通りであった。

実験	吸光度(500nm)
A	0.121
B	0.148
C	0.118
D	0.121

上記実験Dは、アスコルビン酸塩を含有し水酸化ナトリウム溶液で処理したもので、アスコルビン酸塩による妨害作用は示されなかった。一方、実験Bはアスコルビン酸塩を含有しているが、水酸化ナトリウム溶液による処理はしておらず、妨害作用があることを示した。

実例 2

血清検体を部分標本に分け、下記の如く、μLの容量単位にて混合処理したのち、インキュベート処理した。

実験

C	500	0	50	50
D	500	50	50	0

次に、下記テトラゾリウム呈色試薬を使用した。

(0.12M Na₂CO₃/NaHCO₃ pH10.8)

11.64gのNa₂CO₃と0.52gのNaHCO₃をNaOHによりpH10.8に調整し、0.29gの2-(4-イオドフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-フェニルテトラゾリウムクロライド(2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride)(INT)を加え、脱イオン水により1Lにしたもの。

次に、上記4種類の実験における血清を混合処理し、その後正確に30分たってから各々の血清を20μLとり、1mLの呈色試薬と混合させた。そして、900秒間(12分間)発色させたのち、ただちに各々の血清につき適切な分光光度計を使用して500nmの吸光度を測定し

-12-

	A	B	C	D
血清	500	500	500	500
(アスコルビン酸塩)				
(1.1mM)	0	50	0	50
H ₂ O	50	0	50	0
(インキュベーション)				
温度(°C)	4	4	37	37

ここで、各検体は200分間インキュベート処理したのち、上記実例1に従い測定を行なった。

吸光度の測定結果は以下の通りであった。

実験	吸光度(500nm)
A	0.105
B	0.117
C	0.100
D	0.105

以上の実験で判るように、アスコルビン酸塩妨害物質を除去する手段として温度の上昇を利用することができる。

実例 3

1.3mMの1-デオキシ,1-モルフォリノ フルクトース(1-deoxy,1-morpholino fructose)(DMF)を含むした血清検体を用意し、上記実例1に従い処理した。

吸光度の測定結果は次の通りであった。

実 験	吸 光 度 (500nm)
A	0.158
B	0.181
C	0.159
D	0.161

この結果から、本測定用の標準物質として用意した合成フルクトース化合物であるDMFは以上の検体調整段階では影響を受けないことが判る。

実例 4

検体処理については上記実例1に従ったが、本実例では水酸化ナトリウム溶液に代え、酸化剤である2.0mMのメキュリック アセテート(mercuric acetate)を使用した。

-15-

以上の実験結果より、水酸化ナトリウムを使用し30分間インキュベーションすることでも、グルタチオンによる妨害作用を除去することができる。

実例 6

上記実例1に従い血清検体の処理を行なったが、本実例では、実験Cと実験Dで使用すべき水酸化ナトリウムに代えて、アスコルバート オキシダーゼ 試薬キット [ベーリンガー・マンハイム バイオケミカルズ、インディアナポリス、インディア (Boehringer, Mannheim Biochemicals, Indianapolis, Indiana)より入手。製品番号:#736619.]を使用した。また、次のような容量で水をμl単位にて用意し、各血清の希釈に使用した。即ち、実験A及び実験Cは50、実験B及び実験Dは0。尚、前記試薬キットには約17ユニットのアスコルバート オキシダーゼ酵素(E, C. 番号:1.10.3.3)が含まれ、該酵素は水溶液からアスコルビン酸を除去するために使用される。

-17-

吸光度の測定結果は以下の如くである。

実 験	吸 光 度 (500nm)
A	0.141
B	0.153
C	0.121
D	0.126

この実験から、メキュリック アセテートがアスコルビン酸塩による妨害作用を低下させる働きがあることが判る。

実例 5

検体処理については上記実例1に従ったが、本実例では前記アスコルビン酸溶液に代えて、10mM濃度の還元グルタチオン[シグマ ケミカル(Sigma Chemical)製]を使用した。

吸光度の測定結果は次の通り。

実 験	吸 光 度 (500nm)
A	0.090
B	0.135
C	0.087
D	0.084

-16-

本実例では、30分間のインキュベーション処理過程で数回この試薬キットを使用し血清と混合させた。

吸光度の測定結果は以下の通り。

実 験	吸 光 度 (500nm)
A	0.076
B	0.105
C	0.077
D	0.081

以上の実験で、アスコルバート オキシダーゼがアスコルビン酸塩による妨害作用を低下させる働きがあることが判る。

実例 7

本実例では、ゲル濾過クロマトグラフィーを利用して血清検体を脱塩処理した。すなわち、用意した血清検体を500μlの分量に分け、2つの500μlの検体にした。その一方の第1分量検体に50μlの水を加え、他方の第2分量検体に1.1mMアスコルビン酸溶液50μlを加えた。次に、脱塩処理用カラム[アイソラブ、インク、

-18-

(Isolab, Inc.) 製品番号: # Q S - 2 B] を 2 個用意し、これを生理食塩水で平衡させた。ここで、前記 500 μ l 検体の各々を別々の該脱塩処理用カラムに加え、溶出処理を行なった。

次に、かかる脱塩処理用カラムの各々に 300 μ l の生理食塩水を加え、溶出処理を行なった。さらに、各カラムの下に受け皿を設置したのち、500 μ l の生理食塩水を各カラムに加え、溶出液を採集した。採集して溶液には脱塩処理された血清が含まれていた。

さて、こうして脱塩処理した溶出液を部分標本に分け μ l 単位で、下記の溶液と混合させた。

実験(溶出液)	の対象	(溶出液)	1.1mM アスコ	の量	ルビン酸塩	量
A	第1分量検体	200	0	20		
B	第1分量検体	200	20	0		
C	第2分量検体	200	0	20		

次に、上記各実験における検体を各々 50 μ l とし、上記実験 1 の如く、夫々に 1 ml の呈色試

薬を混合させた。発色処理は上記実験 1 に従い行なった。

吸光度の測定結果は次の通りであった。

実験	吸光度(500nm)
A	0.078
B	0.228
C	0.074

以上の実験から、検体の脱塩処理を先に行ないその後フルクトサミンの測定をすればアスコルビン酸塩の妨害作用を除去できることが判る。

実験 8

血清検体を 3 つ用意し、上記実験 1 の実験 B に従い処理した。そして、4°C にて保存し、上記実験 1 に従い当日、翌日及び 4 日目の日程の順で測定を行なった。また、前記ヨーロッパ特許と同様な方法で各日程毎に DMF 標準物質を測定して吸光度と DMF 量との関係を検査した。同時に検体ブランクも差し引いた。依って、検体中のフルクトサミン濃度の測定結果は下記表に示す如くである。

-19-

実験 1

日程	フルクトサミン(mM)(DMF 当量として)		
検体番号:	1	2	3
当日	1.40	1.33	2.63
翌日	1.35	1.38	2.62
4日目	1.11	1.12	2.38

以上のことから、検体を 4°C にて保存するだけでアスコルビン酸塩の妨害作用を減少させることができる。

実験 9

本実験では、連続フロー方式の自動分析装置を使用してフルクトサミン測定を行なった。使用した自動分析装置は前記ヨーロッパ特許の実験 2 と同じくテクニコン オートアナライザー (Technicon Autoanalyzer) [製造元: テクニコン インストリユーメンツ コーポ., ニューヨーク州, ターリタウン (Technicon Instruments Corp., Tarrytown, N. Y.)] である。この分析装置を操作し、検体の割合を 1 として 15 mM 水酸化ナトリウムの割合を 3 と

-20-

して、混合処理するようプログラムさせた。この混合処理で、得た混合液を 37°C にて 5 分間加熱した。

しかるのち、上記実験 1 で扱ったテトラゾリウム呈色試薬を 3 の割合 (全体量 7 の割合に対して) で前記混合液に混合するよう分析装置をプログラムさせた。この混合処理で得た混合液を 37°C にて 2 分間インキュベート処理した。

次に、分析装置を操作して 500nm にて吸光度の測定を行なうようプログラムさせた。上記実験 1 の実験 A 及び実験 B に従い、正常血清検体と高濃度血清検体とを混合させ、ただちに分析処理した。

吸光度の結果は以下の通り。

検体	アスコルビン酸塩の添加	吸光度(500nm)
正常	添加しない。	0.112
正常	添加した。	0.113
高濃度	添加しない。	0.196
高濃度	添加した。	0.194

-21-

-438-

-22-

実例 10

正常血清検体 1 つと高濃度血清検体 1 つを用意し、これらを上記実例 1 の実験 D に従い処理した。その後、各検体を混合処理してから正確に 30 分たった時点で、検体を夫々 20 μ とり 1 mL の呈色試薬と混合させた。次に 900 秒間発色させた。900 秒たった時点で 2.0 mL の 1 N 塩酸を加え混合処理し発色反応を停止させた。各検体の吸光度の測定にあたっては、前記塩酸を加えてから 5 分、10 分及び 30 分たった時間の順で測定した。

測定結果は以下の通りであった。

吸光度 (500nm)

実験	血清検体	5 分	10 分	30 分
A	正常	0.063	0.064	0.063
B	高濃度	0.113	0.113	0.111

以上の結果から、発色反応が停止可能であつて、発色した色が安定していることが判る。従つて、都合のよい時に呈色測定を行なうことができる。

以上、現在の特許の状況に則し、本発明の最上の形態並びに好ましい実施態様を詳細に説明してきたが、本発明はこれに限定されず、発明の範囲は特許請求の範囲に定められている。

THIS PAGE BLANK (USPTO)